

复方聚甲酚磺醛软膏微生物限度检查法方法验证

苏智阳¹, 李彩霞² (1. 福建厦门市药品检验所 厦门 361012; 2. 福建厦门大学附属第一医院药学部 厦门 361002)

摘要: **目的** 建立复方聚甲酚磺醛软膏微生物限度检查法方法。 **方法** 采用《中国药典》2010 版二部附录 X1J 微生物限度检查法进行方法学验证。 **结果** 通过试验确定复方聚甲酚磺醛软膏细菌数和控制菌采用薄膜过滤法, 霉菌和酵母菌数采用直接接种法。 **结论** 此方法可用于复方聚甲酚磺醛软膏微生物限度检查。

关键词: 微生物限度; 复方聚甲酚磺醛软膏; 方法验证; 薄膜过滤法; 直接接种法

中图分类号: R927.12 文献标识码: B 文章编号: 1006-3765(2012)-09-0075-03

复方聚甲酚磺醛软膏为聚甲酚磺醛和盐酸辛可卡因的复方软膏剂, 临床上主要用于治疗痔疮, 尤其肛门发炎引至流血、肛裂和皲裂; 肛门疼痛; 因肛门或直肠的炎症而引起的肛门湿疹、直肠手术后的伤口等。为此, 根据《中国药典》2010 年版的有关规定, 对复方聚甲酚磺醛软膏微生物限度检查方法进行验证, 以确定其是否适用于本品的微生物限度检查, 从而准确地检出样品中污染的微生物。

1 试药与仪器

1.1 试验样品 药品名称: 复方聚甲酚磺醛软膏, 批号: 10071、10091、10101, 来源: 由某进口企业提供。

1.2 验证用仪器 HTY-2000 型智能集菌仪、一次性无菌过滤器、电动吸液枪等。

1.3 验证用菌种 金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]; 大肠埃希菌[CMCC(B)44102]; 枯草芽孢杆菌[CMCC(F)63501]; 白色念珠菌[CMCC(F)98001]; 黑曲霉[CMCC(F)98003], 铜绿假单胞菌[CMCC(F)10104]均由中国食品药品检定研究院提供。

1.4 验证用培养基及稀释剂 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液, 灭菌生理盐水(自制), 玫瑰红钠琼脂培养基、营养琼脂培养基、乳糖胆盐培养基、改良马丁琼脂培养基、溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基、甘露醇氯化钠琼脂培养基、营养肉汤均由北京陆桥技术有限公司生产。

2 方法与结果

2.1 菌液制备 ①取经 35~37℃ 培养 18~24h 的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌的肉汤培养物 1mL 加 9mL 灭菌生理盐水, 采用 10 倍递增稀释法, 稀释至 10^{-5} ~ 10^{-7} , 控制细菌数约为 50~100cfu·mL⁻¹。②取经 23~28℃ 培养 18~24h 的白色念珠菌液体培养物 1mL 加 9mL 灭菌生理盐水, 采用 10 倍递增稀释法, 稀释至 10^{-5} ~ 10^{-7} , 菌数约为 50~100cfu·mL⁻¹。③取经 23~28℃ 培养 7d 的黑曲霉菌斜面培养物, 加 3~5mL 灭菌生理盐水洗下霉菌孢子, 采用管口带有薄无菌棉花的毛细吸管吸出菌液, 取 1mL 加 9mL 灭菌生理盐水, 逐管 10 倍稀释为 10^{-4} , 菌数约为 50~100cfu·

mL⁻¹。

2.2 供试液制备 每批各取供试品 10g, 加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100mL, 再加入 1% 的吐温-80, 混匀, 作为 1:10 的供试液。

2.3 细菌、霉菌及酵母菌计数验证试验

2.3.1 细菌、霉菌及酵母菌计数 先采用直接接种法进行试验, 计算各试验菌株的回收率。回收率(%) = {(试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/菌液组平均菌落数} × 100%。试验组: 各取每批 1:10 供试液 1mL 和试验菌液 1mL, 分别注入平板中, 立即倾注相应琼脂培养基, 每株试验菌平行制备 2 个平板, 按平皿法测定其菌数。菌液组: 取试验菌液 1mL 注入平板中, 立即倾注相应琼脂培养基, 每株试验菌平行制备 2 个平板, 测定所加的试验菌数。供试品对照组: 各取 1:10 供试液 1mL 注入平板中, 按试验组操作, 不加菌液, 平行制备 2 个平板, 测定样品本底菌。计算各试验菌株的回收率(见表 1)。

从表 1 的回收率看, 白色念珠菌和黑曲霉菌的回收率均大于 70%, 故霉菌和酵母菌数可采用直接接种法, 由于聚甲酚磺醛具有较强的抑菌作用, 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的回收率均小于 70%, 故考虑细菌采用薄膜过滤法。

2.3.2 薄膜过滤法: 试验组: 取 1:10 供试液 1mL, 至 100mL 蛋白胨水, 全量过滤, 用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗 2 次, 每张滤膜每次冲洗量为 100mL, 在最后一次冲洗中加入 1mL 的细菌菌液, 取出滤膜, 菌面朝上贴于相应的培养基平板上, 每种细菌平行制备 2 张滤膜, 置规定温度中培养 48h。菌液组: 分别取大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌各 1mL, 至 100mL 蛋白胨水, 全量过滤, 取出滤膜, 菌面朝上贴于相应的培养基平板上, 每种菌平行制备 2 张滤膜, 置规定温度中培养 48h。供试品对照组: 取 1:10 供试液 1mL, 至 100mL 蛋白胨水, 全量过滤, 用 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗 2 次, 每张滤膜每次冲洗量为 100mL, 取出滤膜贴于相应的培养基平板上, 平行制备 2 张滤膜, 置规定温度中培养 48h。计算各试验菌株的回收率, 回收率(%) = {(试验组平均菌落数-供试品对照组平均菌落数)/菌液组平均菌落数} × 100%(见表 2)。

作者简介: 苏智阳 男。本科。职称: 主管药师。联系电话: 13859919290, E-mail: sogor88@163.com

表 1 计数验证菌各菌株回收率结果

组别		大肠埃希菌			金黄色葡萄球菌			枯草芽孢杆菌			白色念珠菌			黑曲霉菌		
		实验 1	实验 2	实验 3	实验 1	实验 2	实验 3	实验 1	实验 2	实验 3	实验 1	实验 2	实验 3	实验 1	实验 2	实验 3
试验组	菌种	29	27	31	39	42	31	22	27	28	93	95	83	71	76	68
	计数	33	29	33	33	36	30	26	29	28	88	97	85	70	78	64
	均值	31	28	32	36	39	30	24	28	28	90	96	84	70	77	66
菌液组	菌种	70	75	79	96	92	97	76	80	72	102	111	97	79	86	83
	计数	72	73	81	94	89	92	82	81	74	93	106	99	77	85	82
	均值	71	74	80	95	90	94	79	80	73	98	108	98	78	86	82
供试品对照组	菌种	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	计数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	均值	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
回收率%		44	38	40	38	43	32	30	35	38	92	89	86	90	90	80

实验 1: 10071, 实验 2: 10091, 实验 3: 10101

表 2 薄膜过滤法

组别		大肠埃希菌			金黄色葡萄球菌			枯草芽孢杆菌		
		实验 1	实验 2	实验 3	实验 1	实验 2	实验 3	实验 1	实验 2	实验 3
试验组	菌种	51	54	49	77	63	60	46	48	45
	计数	50	50	51	77	67	64	42	49	46
	均值	50	52	50	77	65	62	44	48	45
菌液组	菌种	59	62	51	88	72	68	59	60	52
	计数	56	58	55	86	71	69	61	59	53
	均值	58	60	53	87	72	68	55	60	52
供试品对照组	菌种	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	计数	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	均值	0	0	0	0	0	0	0	0	0
回收率/ %		85	87	88	88	90	91	80	80	87

实验 1: 10071, 实验 2: 10091, 实验 3: 10101

回收率均大于 70%, 故细菌数可采用薄膜过滤法

2.4 控制菌检查方法的验证 因本样品为外用制剂, 所以要
对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌进行控制菌验证试验。

2.4.1 控制菌常规检查方法: 试验组: 分别取 3 批样品的 1:
10 供试液 10mL, 分别加入相应的 100mL 的乳糖胆盐培养基
或 100mL 的乳糖胆盐培养基, 同时加入相应的金黄色葡萄球

菌或铜绿假单胞菌的菌液 1mL, 置 35℃ 培养 24h, 取上述培养
物, 划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基或溴化十六烷基三
甲铵琼脂培养基平板上, 置 35℃ 培养 24~ 72h, 观察结果(见
表 3)。

表 3 控制菌常规检查方法

组别	培养基	试验组	阴性对照组	培养基	试验组	阴性对照组
实验 1	营养肉汤	-	-	乳糖胆盐培养基	-	-
	甘露醇氯化钠琼脂培养基	无菌落生长	无菌落生长	溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基	无菌落生长	无菌落生长
实验 2	营养肉汤	-	-	乳糖胆盐培养基	-	-
	甘露醇氯化钠琼脂培养基	无菌落生长	无菌落生长	溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基	无菌落生长	无菌落生长
实验 3	营养肉汤	-	-	乳糖胆盐培养基	-	-
	甘露醇氯化钠琼脂培养基	无菌落生长	无菌落生长	溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基	无菌落生长	无菌落生长

实验 1: 10071, 实验 2: 10091, 实验 3: 10101

从表 3 可看出控制菌常规检查法不能检出。

2.4.1 控制菌薄膜过滤法: 试验组: 分别取 3 批样品的 1:
10 供试液 10mL, 至 100mL 蛋白胨水, 全量过滤, 用 pH 7.0 氯化
钠蛋白胨缓冲液冲洗 2 次, 每张滤膜每次冲洗量为 100mL,
在最后一次冲洗中加入 1mL 的金黄色葡萄球菌或铜绿假单

胞菌的菌液, 取出滤膜分别加入相应的 100mL 的乳糖胆盐培
养基或 100mL 的乳糖胆盐培养基, 置 35℃ 培养 24h, 取上述
培养物, 划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基或溴化十六烷
基三甲铵琼脂培养基平板上, 置 35℃ 培养 24~ 72h, 观察结果
(见表 4)。

表 4 控制菌薄膜过滤法

组别	培养基	试验组	阴性对照组	培养基	试验组	阴性对照组
实验 1	营养肉汤	+	-	乳糖胆盐培养基	+	-
	甘露醇氯化钠琼脂培养基	典型菌落生长	无菌落生长	溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基	典型菌落生长	无菌落生长
实验 2	营养肉汤	+	-	乳糖胆盐培养基	+	-
	甘露醇氯化钠琼脂培养基	典型菌落生长	无菌落生长	溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基	典型菌落生长	无菌落生长
实验 3	营养肉汤	+	-	乳糖胆盐培养基	+	-
	甘露醇氯化钠琼脂培养基	典型菌落生长	无菌落生长	溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基	典型菌落生长	无菌落生长

实验 1: 10071, 实验 2: 10091, 实验 3: 10101

3 结论

通过以上试验表明复方聚甲酚磺醛软膏对细菌和控制菌具有较强的抑菌作用,故采用薄膜过滤法(冲洗量 200mL)就可消除其抑菌作用,霉菌和酵母菌直接接种法的回收率大于 70%,可以用常规法。

参考文献

[1]国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010, 附录 107.

[2]马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000, 89-90.

[3]中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范[M]. 北京: 中医药科技出版社, 2010, 351.

HPLC 法测定石黄抗菌胶囊中黄芩苷含量的探讨

王荔青, 王鼎峰(福建莆田市药品检验所 莆田 351100)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定石黄抗菌胶囊中黄芩苷含量的方法。 **方法** 采用 C₁₈柱(250mm×4.6mm, 5μm), 流动相为甲醇-水-冰醋酸(50:50:1), 流速为 1.0mL·min⁻¹, 检测波长为 278nm。 **结果** 黄芩苷在 15.025~72.125μg·mL⁻¹范围内线性关系良好(r=0.9999), 加样回收率为 98.94%(RSD%=2.65%, n=5)。 **结论** 本方法简便、准确、重现性好, 且分离效果好, 专属性强, 可用于石黄抗菌胶囊中黄芩苷的含量测定。

关键词: 石黄抗菌胶囊; 黄芩苷; 高效液相色谱法; 含量测定
 中图分类号: R927.2 文献标识码: B 文章编号: 1006-3765(2012)-09-0077-02

石黄抗菌胶囊是国家药品标准 YBZ02562009 收载的中药成方制剂, 由石榴皮干膏粉、黄芩干膏粉、地榆干膏粉、黄芩细粉等四味中药组成, 具有抗菌消炎的功效。临床上用于菌痢、上呼吸道感染、扁桃体炎、尿路感染等症的治疗。本文选用高效液相色谱法测定处方中黄芩的黄芩苷含量, 以控制其质量。研究结果表明: 该方法简便、准确、重现性好, 且分离效果好, 专属性强, 可用于该制剂中黄芩苷的质量控制。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 LG-2010AHT 高效液相色谱仪(日本岛津制作所); BS-210S 型电子分析天平(德国赛多利斯集团公司); KQ-250DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所 批号: 110715-201016 供含量测定用); 石黄抗菌胶囊(广西某制药有限公司 批号: 110601、110605、110616); 甲醇为色谱纯, 乙醇和冰醋酸为分析纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

作者简介: 王荔青, 女(1969.02-)。毕业于湖北制药工业学校药检专业。职称: 主管药师。从事药品检验工作。联系电话: 13905944267

2.1 色谱条件 以十八烷基硅键合硅胶为填充剂, 流动相为甲醇-水-冰醋酸(50:50:1), 流速为 1.0mL·min⁻¹, 进样量 10μL, 检测波长 278nm, 室温。

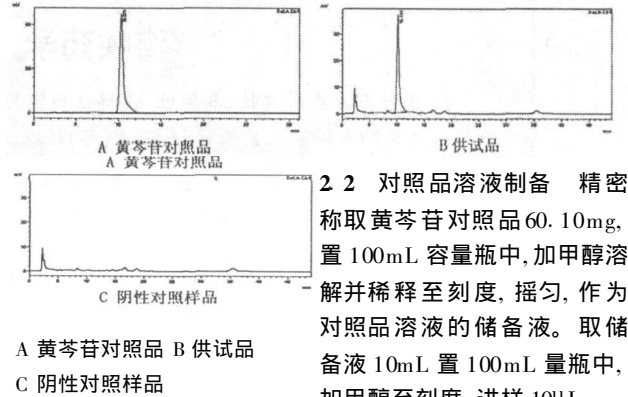


图 1 黄芩苷色谱图

2.2 对照品溶液制备 精密称取黄芩苷对照品 60.10mg, 置 100mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液的储备液。取储备液 10mL 置 100mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 进样 10μL。

2.3 供试品溶液制备 取 20 粒石黄抗菌胶囊的内容物, 研细、混匀, 取约 0.6g, 精密称定, 加 70% 的乙醇 40mL, 超声 2h, 滤入 100mL 量瓶中, 用少量 70% 的乙醇洗涤容器和滤渣, 滤液滤过, 滤液合并入量瓶中, 加 70% 的乙醇至刻度, 摇匀, 精密量取 1mL 置 10mL 量瓶中,